

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

6
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° d publication :
(A n'utiliser que pour les
commandes de reproduction).

2 302 745

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 75 07316

(54) Esters hétérosidiques d'acide caféique, leurs procédés de préparation et médicaments contenant de tels esters.

(51) Classification internationale (Int. Cl.²). A 61 K 31/70; C 07 H 15/18.

(22) Date de dépôt 7 mars 1975, à 16 h 24 mn.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée :

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande B.O.P.I. — «Listes» n. 40 du 1-10-1976.

(71) Déposant : Société dite : SOCIÉTÉ CIVILE DE RECHERCHES ET D'ÉTUDES NOUVELLES
S.C.R.E.E.N., résidant en France.

(72) Invention de :

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Cabinet Plasseraud.

L'invention est relative à de nouv aux médicaments et à la préparation de leurs princip s actifs par extraction à partir de matières végétales.

Il est connu que l'on peut extraire de certains végétaux
5 des esters hétérosidiques d'acide caféique. Plus précisément, on a préparé un ester hétérosidique, dérivé d'acide caféique, de rhamnose, de glucose et de dihydroxyphényléthanol, auquel on a donné le nom de verbascoside pour rappeler la plante particulière d'où il était extrait, le Verbascum sinuatum. Toutefois,
10 les recherches effectuées sur ces produits se sont limitées à des études de structure, et on ne leur avait trouvé, à ce jour, aucune propriété qui puisse les rendre utiles dans une application industrielle quelconque.

La présente invention résulte de la découverte que des
15 esters hétérosidiques d'acide caféique, que l'on peut extraire de divers végétaux et plus particulièrement des plantes des familles des Scrofulariacées, des Orobanchacées, des Labiées ou des Acanthacées, présentent des propriétés pharmacologiques intéressantes qui les rendent utiles dans la constitution de médicaments.

Conformément à l'invention, on peut extraire des principes
20 actifs, constitués notamment d'esters hétérosidiques d'acide caféique et utiles en pharmacie, par un procédé suivant lequel on fait macérer des plantes constituées par des plantes tubiflorales, de préférence des Scrofulariacées, des Orobanchacées,
25 des Labiées, des Acanthacées ou des plantes analogues, dans un alcool, on recueille la solution alcoolique, on fait évaporer l'alcool, on soumet la phase aqueuse résiduelle à une extraction par l'acétate d'éthyle et on recueille la fraction soluble dans l'acétate d'éthyle. L'alcool peut être notamment l'éthanol ou le méthanol.

30 Il est en outre préférable de soumettre les plantes utilisées à un dégraissage préalable, de préférence effectué à l'éther de pétrole.

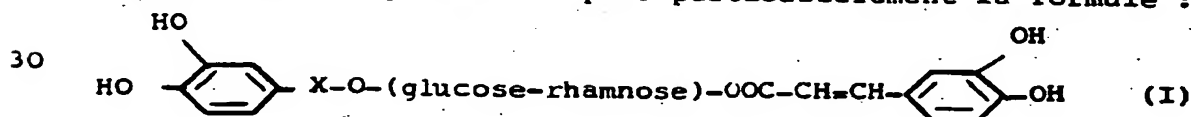
Ce traitement peut avantageusement être complété par un dégraissage du résidu de la solution alcoolique, effectué avant
35 l'extraction par l'acétate d'éthyle, au moyen d'un solvant dégraissant tel que l'éther éthylique et/ou l'éther de pétrole. On peut ainsi procéder notamment comme suit : la plante entière, séchée, est broyée, puis dégraissée par de l'éther de pétrole dans un appareil du type Soxhlet. Le résidu, ou marc, débarrassé
40 d'éther de pétrole, est traité par macération dans de l'alcool

éthylque à 80°. La solution alcoolique est soumise à une concentration sous vide jusqu'à élimination de l'alcool. La phase liquide aqueuse restante est ensuite dépigmentée par traitement à l'éther, lequel est éliminé, puis elle est traitée par de l'acétate d'éthyle. La phase à l'acétate d'éthyle est déshydratée et concentrée à sec ; elle laisse alors déposer une poudre blanc crème, qui constitue un extrait selon l'invention.

Selon un mode de mise en oeuvre préféré du procédé, on peut notamment utiliser des plantes de la famille des Orobanchacées, qui sont des phanérogames parasites dépourvus de chlorophylle, et, parmi ces plantes, plus particulièrement les espèces du genre *Orobanche* et celles du genre *Phelypaea*. Ces espèces présentent l'avantage d'être relativement riches en dérivés caféiques et de conduire, par conséquent, à de bons rendements d'extraction.

Toutefois, les plantes de la famille des Scrofulariacées, telles que le *Verbascum*, et celles de la famille des Acanthacées, telles que *Acanthus*, ont l'intérêt d'être souvent plus facilement disponibles. Le procédé est avantageusement complété, tout spécialement dans ce cas, par une purification de l'extrait en milieu aqueux, sur cellulose notamment, puis par une nouvelle extraction par de l'acétate d'éthyle additionné de méthanol.

Le procédé selon l'invention permet d'obtenir notamment des extraits que l'on appellera par la suite "extraits polyphénoliques", dont l'analyse montre qu'il s'agit de mélanges contenant essentiellement divers isomères constitués d'esters hétérosidiques d'acide caféique dérivés d'un hétéroside de dihydroxyphénylalcaneol et présentant plus particulièrement la formule :



dans laquelle X est un groupement :

$-(\text{CH}_2)_n-$ où n est un entier de 1 à 6,

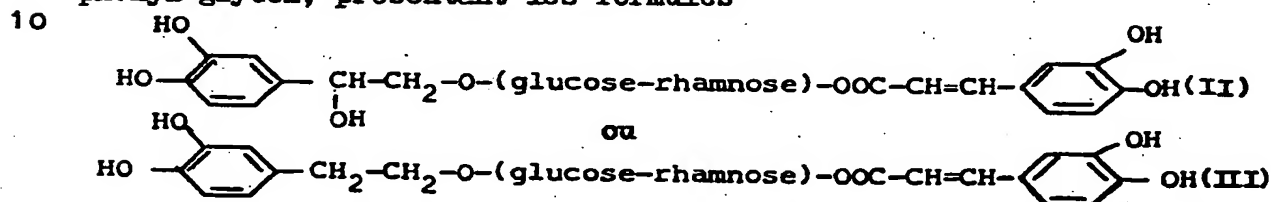
ou $\begin{array}{c} -\text{CH}- \\ | \\ \text{OH} \end{array} (\text{CH}_2)_m-$ où m est un entier de 0 à 5.

Certains des isomères peuvent avantageusement être séparés à partir de cet extrait complexe en complétant le procédé par une ou plusieurs recristallisations dans l'eau.

Les proportions relatives des isomères dans l'extrait polyphénolique varient suivant les conditions de traitement et suivant la nature précise des plantes utilisées.

Naturellement, l'invention a aussi pour objet les composés
5 obtenus conformément au procédé déjà défini.

Parmi les composés de formule (I), des composés préférés selon l'invention sont les esters hétérosidiques d'acide caféique dérivés d'hétérosides de dihydroxyphényl-éthanol et de dihydroxyphényl-glycol, présentant les formules



De tels composés se trouvent en quantités particulièrement
15 importantes dans les extraits polyphénoliques des Acanthacées ou Scrofulariacées pour un composé de formule (III) auquel on a donné le nom de verbascoside, et dans les extraits polyphénoliques des Orobanchacées pour un composé de formule (II) auquel on a donné le nom d'orobanchoside. Ils peuvent être isolés par cristallisation à partir des solutions aqueuses d'extrait polyphénolique
20 et purifiés par recristallisation dans l'eau ou l'alcool.

D'autres isomères des esters caféiques selon l'invention peuvent encore être obtenus par chauffage en milieu légèrement acide du verbascoside ou de l'orobanchoside, ou de leurs mélanges,
25 ou encore directement de l'extrait polyphénolique. Ainsi, le chauffage en milieu légèrement acide de l'orobanchoside, de préférence par ébullition en milieu à pH 6 à 6,8, conduit à un isomère présentant la formule générale déjà indiquée et que l'on a dénommé "isoorobanchoside". De même le chauffage en milieu légèrement acide du verbascoside, dans des conditions analogues,
30 conduit à un isomère de la même formule générale que l'on a dénommé "isoverbascoside".

Tous les isomères ainsi isolés présentent, comme l'extrait polyphénolique, des propriétés pharmacologiques qui en font des principes actifs utiles pour la constitution de médicaments. De
35 plus, ils ont l'avantage de pouvoir être obtenus facilement à l'état cristallisé, séparément ou en mélange, par le procédé selon l'invention.

L'invention vise donc également les médicaments qui contiennent comme principe actif au moins un ester hétérosidique d'acide caféique, et notamment ceux qui contiennent au moins un ester hétérosidique d'acide caféique dérivé d'un hétéroside de dihydroxyphényl-alcanol, présentant de préférence la formule (I) ci-dessus, ou plus particulièrement la formule (II), ou qui contiennent au moins un principe actif tel que ceux que l'on peut extraire de plantes de la famille des Orobanchacées, des Scrofulariacées, des Labiées ou des Acanthacées, par le procédé déjà défini, dans ses différentes variantes de mise en oeuvre.

Ces principes actifs présentent en particulier des propriétés potentialisatrices de la dihydroxyphénylalanine, ou dopa, et ils sont donc avantageusement administrés, en combinaison avec la dopa, dans les différentes indications thérapeutiques de celle-ci, la plus importante de ces indications concernant actuellement le traitement de la maladie de Parkinson.

On sait que la dopa, et plus particulièrement sa forme lévogyre ou L.dopa, est considérée comme le plus efficace des médicaments antiparkinsoniens. Malheureusement, ce médicament entraîne une série d'effets secondaires qui affectent les fonctions d'activité cardio-vasculaire, et dont l'intensité peut aboutir à une intolérance. On sait également que ces effets sont dus à la présence en grande quantité de dopamine provenant de l'activité extra-cérébrale de la dopa-décarboxylase qui assure la décarboxylation de la dopa. C'est pourquoi il est d'un grand intérêt, dans le traitement de la maladie de Parkinson, de pouvoir associer à la L.dopa un inhibiteur de la dopa-décarboxylase extra-cérébrale. Les principes actifs selon l'invention se sont révélés des inhibiteurs de ce type.

De plus, ils ont l'avantage de présenter une activité plus longue et plus efficace que celle de composés chimiques d'origine synthétique, comme l'acide caféique lui-même, et ils sont dénués d'effet secondaire.

Les principes actifs selon l'invention présentent également d'autres propriétés pharmacologiques. En particulier, les extraits polyphénoliques présentent une activité β -bloquante qui renforce encore leur intérêt dans le traitement de la maladie de Parkinson. En effet, on évite alors d'avoir à administrer des médicaments β -bloquants parallèlement aux médicaments potentialisateurs de dopa, comme il est usuel dans le traitement de

la maladie de Parkinson, ou tout au moins on peut diminuer sensiblement les doses administrées, et les activités nécessaires se trouvent réunies dans un même produit d'origine végétale, d'effet moins fugace et mieux toléré que les produits utilisés de manière classique.

Il est bien évident que l'invention a aussi pour objet les compositions pharmaceutiques préparées en particulier pour le traitement de la maladie de Parkinson, qui contiennent un ester hétérosidique d'acide caféique, ou, plus particulièrement, un principe actif obtenu par le procédé selon l'invention, en association avec la dihydroxyphénylalanine, de préférence sous sa forme lévogyre.

L'invention sera maintenant décrite plus en détail dans le cadre d'exemples particuliers, nullement limitatifs, décrivant la préparation des principes actifs, leur constitution et leurs propriétés pharmacologiques.

EXEMPLE 1 - Préparation d'un extrait polyphénolique

Un extrait polyphénolique est préparé de la manière suivante, à partir de plantes du genre Orobanche, et plus particulièrement des espèces Orobanche hederæ Duby et Orobanche rapum Thuell.

Les plantes entières, récoltées en juin-juillet, sont mises à sécher immédiatement après la récolte, dans un local aéré, et à l'abri de la lumière.

400 g de plante entièrement sèche, après broyage en poudre demi-fine, sont dégraissés et dépigmentés avec 6 litres d'éther de pétrole (40°-60°) dans un appareil de type Soxhlet pendant 10 à 12 heures.

La poudre végétale ainsi traitée est séchée à l'air, puis mise à macérer à la température de 40°C avec 5 fois 2 litres d'éthanol à 80° et sous agitation mécanique.

Après filtration du marc, les 10 litres de solution alcoolique sont additionnés de 20 ml d'une solution aqueuse de métabisulfite de sodium à 10% qui diminue l'oxydation des principes phénoliques actifs.

Ces solutions, laissées une nuit au réfrigérateur (4°C), sont filtrées puis concentrées, de façon à chasser l'alcool, à l'évaporateur rotatif, sous vide et à faible température (30°C).

L'extrait, devenu aqueux, subit à son tour un dégraissage et une dépigmentation par agitation avec un mélange de :

éther éthylique (débarrassé de ses peroxydes)
éther de pétrole (40°-60°)

dont les volumes respectifs sont 2,5/0,5 litres.

5 Ce même extrait aqueux, débarrassé des traces d'éther, est alors rendu un peu plus aqueux par addition d'eau et épuisé par 18 litres d'acétate d'éthyle redistillé (qui entraîne les principes actifs) dans des ampoules à décantation agitées mécaniquement.

10 Les phases à l'acétate d'éthyle sont desséchées par du sulfate de sodium (pur, sec, de Prolabo) et évaporées à sec, sous vide, jusqu'à disparition complète du solvant organique.

On obtient ainsi 40 g de produit sous la forme d'une poudre légère de couleur blanc crème, qui constitue l'extrait polyphénolique.

15 Rendement : 10% du poids de la plante sèche.

EXEMPLE 2 - Préparation d'orobanchoside.

On fait dissoudre un extrait polyphénolique préparé conformément à l'exemple 1 dans de l'eau distillée chaude, de manière à obtenir une solution à 20% de cet extrait. Après refroidissement de la solution jusqu'à la température ambiante, il se forme 20 des cristaux en longues aiguilles, de couleur beige clair, que l'on recueille. Ces cristaux constituent l'orobanchoside brut.

On purifie les cristaux d'orobanchoside par dissolution dans de l'éthanol absolu, à chaud, en présence d'un peu de charbon végétal en poudre du type connu sous la dénomination "Norit" 25 (Prolabo). La solution est filtrée sur une petite colonne de cellulose (300 M.N.) de un centimètre de hauteur sur deux centimètres de diamètre, bien lavée au préalable à l'eau et à l'éthanol.

30 Le filtrat alcoolique est concentré à l'évaporateur rotatif, sous vide, jusqu'à l'apparition d'un trouble. On laisse cristalliser au réfrigérateur (à + 4°C). Les cristaux ainsi obtenus sont essorés, séchés et recristallisés une ou deux fois dans l'éthanol absolu.

35 Rendement en orobanchoside purifié : 2% du poids de plante sèche.

Les caractéristiques physico-chimiques du produit obtenu sont rassemblées ci-après :

a) Propriétés physiques.

40 - point de fusion : pris au banc de koepler

Début de ramollissement vers 196°C - 200°C

fusion nette : 209°C \pm 1°C.

- Solubilités : insoluble dans l'eau froide,

assez soluble dans l'eau bouillante,

5 soluble dans les solutions alcooliques et hydroalcooliques,

insoluble dans l'éther, le chloroforme, le benzène.

b) Analyse élémentaire

10 trouvé : C = 54,50 %

H = 5,78 %

C = 54,62 %

H = 5,87 %

calculé : C = 54,37 %

H = 5,62 % pour C₂₉H₃₆O₁₆

c) Analyse par chromatographie en couche mince.

15 Adsorbant : couche de cellulose Merck toute prête sur feuille d'aluminium

Solvant : acide acétique à 2% dans l'eau

Durée de migration : une heure 30 minutes

Révélateurs : U.V. et p.nitraniline diazotée (coloration jaune beige)

20 R_f : 0,43 - 0,44.

d) Analyse spectrale.

- Spectre U.V. (dans méthanol) : maximum 223-(233)-(246)-291-335
minimum 265

25 - Spectre en infrarouge (en pastille de KBr) - Places des bandes en cm⁻¹ : 3420 - 2960 - 2935 - 1720 - 1605 - 1520 -
1450 - 1380 - 1300 - 1270 - 1130 - 1060 -
1040 - 1020 - 980 - 850 - 810 - 780 -
570.

- Spectre de résonance magnétique nucléaire (RMN)

30 - 6 protons aromatiques 6,4 ppm δ 7,2 ppm

- 2 protons double liaison trans J = 15 Hz (δ = 6,2 ppm δ = 7,5 ppm)

- 3 protons méthyl J = 6 Hz δ = 1,05 ppm

- 1 proton δ = 5,03 ppm (C₁ rhamnosyl)

35 - 1 proton δ = 4,58 ppm (C₁ glucosyl) (J = 7 Hz)

+ 13 ou 14 protons compris entre 3 ppm et 5,1 ppm.

e) Formule chimique.

40 Des résultats d'analyse ci-dessus et de l'examen des produits séparés par chromatographie en couche mince de cellulose après hydrolyse alcaline de l'orobanchoside, on peut déduire que celui-ci est formé de :

- 1 molécule d'acide caféique
 - 1 molécule de glucose
 - 1 molécule de rhamnose
 - 1 molécule d'alcool β -hydroxy-p(dihydroxy-3,4-phényl)
- 5 éthylique conformément à la formule (II).

EXEMPLE 3 - Préparation d'isoorobanchoside.

L'orobanchoside préparé selon l'exemple 2 est soumis à un chauffage en milieu aqueux, à pH légèrement inférieur à 7, de l'ordre de 0,5 et maintien de la solution à l'ébullition pen-
10 dant 3 heures.

On laisse ensuite refroidir la solution. Des cristaux se déposent ; on les essore et on les purifie, comme décrit dans l'exemple 2. Le produit obtenu, ou isoorobanchoside, est un iso-
mère de l'orobanchoside de l'exemple 2 présentant la même formule
15 générale (II).

EXEMPLE 4 - Préparation de verbascoside.

Le verbascoside est extrait des eaux-mères restant après séparation de l'orobanchoside cristallisé selon l'exemple 2 à partir d'un extrait polyphénolique préparé selon l'exemple 1 et
20 dissous dans l'eau.

Ces eaux-mères sont laissées au réfrigérateur (4°C) dans un bêcher recouvert d'un verre de montre permettant ainsi une cer-
taine évaporation. Au bout d'une semaine environ apparaissent des cristaux réunis en petites boules dans le bêcher.

25 Ces cristaux sont essorés et, après redissolution dans de l'eau à température ambiante (solution à 25-30%), sont remis à cristalliser au réfrigérateur.

Au bout de 48 heures, le verbascoside cristallise. On re-
commence l'opération jusqu'à obtention d'une tache unique de
30 verbascoside sur les chromatogrammes.

Les caractéristiques physico-chimiques de ce produit sont réunies ci-après:

a) Propriétés physiques.

- Point de fusion : (banc de koepler)
35 ramollissement vers 158-160°C
fusion nette vers 170-180°C
- Solubilités : soluble dans l'eau à froid
soluble dans les alcools
insoluble dans l'éther, le chloroforme, le
40 benzène.

b) Chromatographie.

Le produit est analysé par chromatographie sur couche mince dans les mêmes conditions que l'orobanchoside dans l'exemple 2.

La tache correspondant au verbascoside se colore par la p.nitraniline diazotée en brun-jaunâtre bordée de mauve.

$R_f = 0,57$ (solvant : acide acétique 2%)

c) Analyse spectrale.

- Spectre U.V. (dans méthanol) : λ maximum : 223-(234)-(246)-291-333
minimum : 265
- Spectre en infrarouge (en pastille de KBr) - Places des bandes en cm^{-1} : 3400 - 2920 - 1690 - 1595 - 1510 - 1440 - 1370 - 1260 - 1160 - 1115 - 1060 - 1030 - 980 - 810 - 780
- Spectre de résonance magnétique nucléaire
 - 6 protons aromatiques ($6,4 < \delta < 7,2$ ppm)
 - 2 protons double liaison trans $J = 15$ Hz ($\delta = 6,25$ ppm et $\delta = 7,55$ ppm)
 - 3 protons méthyl $J = 6$ Hz $\delta = 1,05$ ppm
 - 1 proton $\delta = 5,12$ (C_1 rhamnosyl)
 - 1 proton $\delta = 4,40$ ppm (C_1 glucosyl) $J = 7$ Hz
 - + 14 protons compris entre 2,6 ppm et 5,0 ppm

De ces résultats et de l'analyse des produits d'hydrolyse du verbascoside, on déduit que celui-ci est dérivé des mêmes constituants, glucose, rhamnose, acide caféique que l'orobanchoside et de β (dihydroxy-3,4 phényl)éthanol et qu'il présente la formule (III).

EXEMPLE 5 - Préparation d'isoverbascoside.

Le verbascoside préparé selon l'exemple 4 est chauffé en milieu aqueux légèrement acide, comme décrit dans l'exemple 3, pour obtenir l'isoverbascoside, isomère de la même formule générale (III).

EXEMPLE 6.

Un extrait polyphénolique d'Orobanche préparé conformément à l'exemple 1 est soumis à une analyse par chromatographie en couche mince de cellulose dans de l'acide acétique à 2% dans l'eau. Après révélation du chromatogramme par les U.V. et la p.nitraniline diazotée, on peut distinguer :

- | | | |
|---------------------------------------|---|--------------|
| en forte concentration - verbascoside | : | $R_f = 0,57$ |
| - orobanchoside | : | $R_f = 0,43$ |

en très faible concentration - isoverbascoside : $R_f = 0,24 - 0,25$
- isoorobanchoside : $R_f = 0,18 - 0,20$
à l'état de traces - acide caféique : $R_f = 0,10$

Les caractéristiques physico-chimiques de l'extrait polyphénolique sont :

- Solubilités : soluble extemporanément dans l'eau à la température ambiante en solution moyennement concentrée (au bout d'une heure, laisse déposer à froid quelques cristaux d'orobanchoside)
soluble dans les alcools et l'acétate d'éthyle, insoluble dans l'éther, le chloroforme, le benzène.

- Spectre U.V. (dans le méthanol) : celui des esters caféiques
 λ maximum : 221-(248)-291-335
minimum : 266

EXEMPLE 7.

Des plantes du genre Verbascum sont séchées et broyées, puis traitées comme il a été décrit dans l'exemple 1, par dégraissage, extraction à l'alcool, dégraissage, extraction à l'acétate d'éthyle. On procède ainsi de la même façon que dans l'exemple 1 jusqu'à l'obtention de l'extrait éthéro-acétique restant après évaporation de l'acétate d'éthyle.

Cet extrait est ensuite dissout dans l'eau et purifié par passage sur une colonne de cellulose et élution grâce à une solution d'acide acétique à 1% dans l'eau. La phase aqueuse est extraite alors par de l'acétate d'éthyle additionné de 3% de méthanol.

Après séchage sur sulfate de sodium anhydre et évaporation à sec, on recueille un résidu pulvérulent de couleur crème, dont l'analyse montre qu'il est constitué en grande partie par du verbascoside répondant à la formule III.

EXEMPLE 8 - Etude toxicologique.

Les principes actifs, d'origine végétale, préparés selon l'invention sont sans toxicité et très bien tolérés.

Pour l'extrait polyphénolique obtenu conformément à l'exemple 1, les résultats de l'étude toxicologique sont les suivants :

- Toxicité aiguë : DL. $50 > 6$ g/kg per os chez la souris

DL. $50 > 6$ g/kg IP chez la souris.

Le test de "traction" est positif 2 heures après l'ingestion du produit à forte dose (1 g/kg en I.P.). Ce test consiste

essentiellement à apprécier l'action du produit sur le tonus musculaire, selon la technique de JULOU et COURVCISIER :

Psychotropic drugs, Milan (1957) 373.

- 5 - Toxicité chronique : à raison de 500 mg/kg-rat pendant 8 semaines. Rien à signaler.

Des résultats analogues sont obtenus avec chacun des principes actifs préparés conformément aux exemples 2 à 7.

EXEMPLE 9 - Activité potentialisatrice de la L.dopa.

- 10 La recherche de la potentialisation de l'activité anti-parkinsonienne de la L.dopa a été réalisée en étudiant l'antagonisme de ces deux substances associées vis-à-vis des tremblements provoqués chez la souris par l'oxotrémonine.

Les tremblements sont enregistrés graphiquement.

Dans tous les cas, le protocole suivant a été suivi :

- 15 Temps 0 = principe actif administré per os
Temps 20 mn = L.dopa administrée per os
Temps 40 mn = 500 γ /kg d'oxotrémonine en I.P.

Les tremblements sont enregistrés pendant 45 minutes après l'administration d'oxotrémonine.

- 20 L'examen des résultats révèle la même activité anti-oxotrémonine avec :

L.dopa seule = 500 mg/kg per os

ou chacune des combinaisons principe actif + L.dopa suivantes :

- 25 1) Extrait polyphénolique d'Orobanch (exemple 1) = 50 mg/kg per os
L.dopa = 50 mg/kg per os
2) Extrait polyphénolique d'Orobanch (exemple 1) = 100 mg/kg per os
L.dopa = 25 mg/kg per os
30 3) Orobanchoside (exemple 2) = 100 mg/kg per os
L.Dopa = 100 mg/kg per os
4) Verbascoside (exemple 4) = 100 mg/kg per os
L.dopa = 100 mg/kg per os.

- 35 Le mécanisme d'action de la potentialisation de la L.dopa est étudié "in vitro" dans les conditions

- Substrat = L.dopa
- Enzyme = poudre acétonique de broyat de rein de cobaye préparée à très basse température
- Inhibiteur enzymatique témoin = acide caféique.

Avec l'extrait polyphénolique obtenu selon l'exemple 1, dans les conditions de l'expérience (pH = 6,8), l'action inhibitrice de la dopa-décarboxylase est négative. Par contre, à pH alcalin, dans l'intestin et à 37°C, cet extrait libère l'acide caféique, qui est actif. Ceci peut expliquer l'activité inhibitrice de la dopa-décarboxylase si l'on admet qu'elle s'effectue dans l'organisme après hydrolyse de l'extrait.

EXEMPLE 10 - Action cardio-vasculaire.

- Pression centrale

La pression carotidienne a été mesurée sur des rats mâles de souche Wistar.

L'administration de 50 mg/kg de l'extrait polyphénolique de l'exemple 1, par voie intraveineuse, entraîne une hypotension franche et fugace, sans modification de la fréquence cardiaque.

- Oreillette isolée de rat.

Le même extrait polyphénolique d'Orobanche, à la dose de 5 mg dans une cuve de 40 ml, annule toutes les actions chronotropes et inotropes positives provoquées par 0,5 γ d'isoprénaline, dans le test de l'oreillette isolée de rat, qui consiste à mesurer le rythme et les contractions d'une oreillette isolée maintenue en survie dans un liquide nutritif, selon la technique décrite dans J. Physiol (1926) - 61, 547.

L'extrait possède donc une action β -bloquante.

- Activité antihypertensive.

L'hypertension expérimentale réalisée par ischémie rénale (technique de Grollman; Proc. Soc. Biol. méd. 1944, 57, 102-104) est diminuée de deux points par administration quotidienne de 300 mg/kg per os d'extrait polyphénolique d'Orobanche préparé selon l'exemple 1.

La chute de la pression artérielle qui débute 3 jours après le début du traitement se maintient pendant toute la durée du traitement. Dix jours après l'arrêt du traitement, la pression artérielle rejoint sa valeur initiale.

Il est à noter que l'extrait ne modifie pas la pression artérielle des animaux normotendus.

- Activité antifibrillante.

Le même extrait polyphénolique n'antagonise pas la fibrillation chloroformique réalisée chez la souris selon la méthode de LAWSON.

EXEMPLE 11 - Activité analgésique

On détermine, pour des doses IP déterminées d'extrait polyphénolique d'Orobanche obtenu sel n l'exemple 1, l'augmentation du seuil de la douleur, selon deux techniques qui utilisent respectivement un stimulus thermique (essai de la plaque chauffante) et un stimulus chimique (essai à la phénylbenzoquinone).

- Plaque chauffante : selon la méthode de WOOLFE (G.) - MAC DONALD (A.D.) J. Pharmacol. exptl. ther (1944) 80, 300.

Ce test est basé sur le principe suivant : une souris placée sur une plaque chauffée à 56°C réagit en 5 à 6 secondes par un lâchement des pattes antérieures ou par un saut. L'administration d'un analgésique a pour effet de prolonger le délai d'apparition de cette réponse.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau suivant qui indique le % d'augmentation du délai d'apparition de la réponse à la douleur.

Temps après administration	30 mn	60 mn	90 mn
Dose : 500 mg/kg I.P.	92	80	50
Dose : 1 g/kg I.P.	170	130	100

- Phénylbenzoquinone : selon la méthode de SIGMUND : J. Pharmacol. exptl. ther (1957), 119, 184.

Ce test est basé sur le principe suivant : après administration préventive d'un analgésique, on injecte une solution alcoolique de phénylbenzoquinone qui a pour but de provoquer des torsions chez l'animal. Les analgésiques préviennent ou inhibent ce syndrome de torsion.

Les résultats sont rapportés ci-après, en % de diminution :

Temps en minutes	5	10	15	20	25	30
Dose : 500 mg/kg I.P.	100	78	69	74	67	65
Dose : 1 g/kg I.P.	100	94	91	85	83	85

Dans les conditions expérimentales et aux doses utilisées, l'extrait étudié possède une forte activité analgésique.

EXEMPLE 12 - Activité anti-inflammatoire : selon la méthode de WINTER - Proc. Soc. Exp. biol. méd. (1962) 111, 544-547.

5 L'injection d'une suspension de kaolin sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure du rat provoque une réaction inflammatoire qui peut être réduite par les substances anti-inflammatoires.

10 Les résultats obtenus avec l'extrait polyphénolique de l'exemple 1 sont consignés dans le tableau suivant, où ils sont exprimés en % de diminution de l'enflure :

Temps en heure	1	2	3	4	5	6
15 Dose : 500 mg/kg I.P.	10	42	25	35	20	10

Dans les conditions expérimentales, le produit étudié possède une activité anti-inflammatoire.

20 EXEMPLE 13 - Actions psychotropes.

Le produit examiné est l'extrait polyphénolique d'Orobanche obtenu selon l'exemple 1.

- Curiosité et motilité.

25 Des souris Swiss sont soumises au test de la planche à trous, selon la méthode de BOISSIER (Thérapie (1962) 17, 1225-1232), qui consiste à étudier à la fois la mobilité et l'exploration chez la souris.

30 Les résultats sont exprimés en pourcentage de variation de l'investigation et de la motilité par rapport aux témoins, dans le tableau ci-après :

Doses	500 mg/kg I.P.	1 g/kg I.P.
Investigation	- 34%	- 79%
Motilité	- 33%	- 65%

35 Aux doses étudiées, le produit diminue l'investigation et la motilité.

- Etude des réflexes

Test de traction : test positif (aucune action du produit) à la dose de 1 g/kg I.P.

Test de rota rod, selon la technique de GROSS (Schw. med. wshr.

(1955) 85, 305, qui consiste à déterminer le temps pendant lequel une souris est capable de se maintenir en équilibre sur une tige horizontale tournant sur elle-même :

5 test positif (aucune action du produit) à la dose de 1 g/kg I.P.

- Potentialisation du sommeil.

10 La potentialisation de la narcose est un test utilisé pour mettre en évidence une action sédatrice générale. En effet, une substance ne provoquant pas le sommeil par elle-même peut, en association, prolonger la durée d'action d'un hypnotique.

15 La potentialisation de la narcose a été déterminée sur des souris mâles de souche Swiss par la technique de l'endormissement (technique de COURVOISIER Arch. int. pharmacod. ther. (1952) 92, 305 : le sommeil induit par une dose sub-hypnotique est prolongé sous l'effet d'un prétraitement par un psycholeptique).

500mg/kg administrés par voie intrapéritonéale entraîne une augmentation du temps de sommeil par rapport aux temps de sommeil des témoins de 43%.

20 Ainsi, le principe actif étudié, sans incidence sur les réflexes, diminue l'investigation et la motilité, et potentialise la narcose barbiturique, faisant preuve d'une action psycholeptique.

EXEMPLE 14

25 Des gélules utilisables en thérapeutique humaine sont dosées à 50 mg d'extrait polyphénolique d'Orobanche selon l'exemple 1 par gélule.

30 Cet extrait peut être administré à des doses journalières variant de 1 à 5 mg/kg, en association avec des doses journalières de L. dopa de 6 à 30 mg/kg.

A titre d'exemple, on administre à un patient souffrant de la maladie de Parkinson, 200 mg d'extrait par jour, en 3 ou 4 prises et en association avec une dose de 1 g de L.dopa par jour.

35 Comme il va de soi et comme il résulte d'ailleurs déjà de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes d'application et de réalisation qui ont été plus spécialement envisagés ; elle en embrasse, au contraire, toutes les variantes.

REVENDEICATIONS

- 1 - Nouveaux médicaments, caractérisés en ce qu'ils contiennent, comme principe actif, au moins un ester hétérosidique d'acide caféique, notamment du type de ceux extraits de plantes de la famille des Scrofulariacées, des Orobanchacées, des Labiées ou des Acanthacées.
- 2 - Procédé d'extraction de principes actifs de médicaments, et notamment d'esters hétérosidiques d'acide caféique, à partir de plantes de la famille des Scrofulariacées, des Orobanchacées, des Labiées ou des Acanthacées, caractérisé en ce que l'on fait macérer la plante dans un alcool, tel que l'éthanol ou le méthanol, on recueille la solution alcoolique, on fait évaporer l'alcool, on reprend le résidu obtenu dans l'eau, on le soumet à une extraction par l'acétate d'éthyle, et l'on recueille la fraction soluble dans l'acétate d'éthyle.
- 3 - Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que la plante est soumise au préalable à un dégraissage par un solvant dégraissant, de préférence l'éther de pétrole.
- 4 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 ou 3, caractérisé en ce que le résidu de la solution alcoolique est soumis à un dégraissage par un solvant tel que l'éther éthylique, l'éther de pétrole, ou leurs mélanges, avant l'extraction par l'acétate d'éthyle.
- 5 - Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que la plante sèche est broyée et dégraissée par l'éther de pétrole, le résidu débarrassé de l'éther de pétrole est traité par macération dans de l'alcool éthylique, la solution alcoolique est soumise à une concentration sous vide jusqu'à élimination de l'alcool, la phase liquide aqueuse restante est ensuite dépigmentée par traitement à l'éther, lequel est alors éliminé, puis traitée par de l'acétate d'éthyle, la phase à l'acétate d'éthyle est déshydratée et concentrée à sec, et l'on recueille la poudre qui cristallise.
- 6 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 5, caractérisé en ce qu'il comprend, en outre, une purification de ladite fraction soluble à l'acétate d'éthyle, préalablement dissout en milieu aqueux, de préférence par absorption des impuretés sur cellulose et élution par une solution diluée d'acide acétique, et extraction subséquente à l'acétate d'éthyle, de préférence additionné de méthanol.
- 7 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 6, caractérisé en ce que l'extrait à l'acétat d'éthyle, de préférence

déshydraté et concentré, est soumis à un .étap de séparation d
ses constituants par dissolution dans l'eau à chaud, refroidisse-
ment et séparation du produit qui cristallise au refroidissement,
lequel est ensuite avantageusement purifié par recristallisation
5 dans l'alcool, et filtration, notamment sur cellulose.

8 - Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que
les eaux-mères restant après ladite séparation sont maintenues au
froid, de préférence aux environs de + 4°C, jusqu'à cristallisation
d'un autre produit qui est recueilli, et avantageusement purifié
10 par recristallisation dans l'eau.

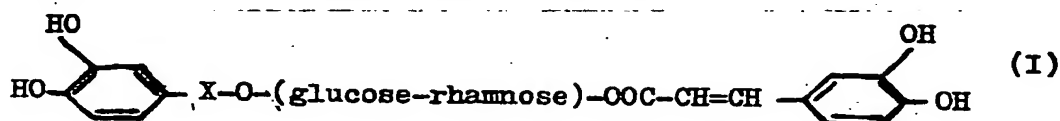
9 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 8,
caractérisé en ce que le produit obtenu est ensuite soumis à un
chauffage, par ébullition en milieu aqueux légèrement acide, à un
pH de l'ordre de 6 à 6,8, et de préférence de l'ordre de 6,5.

15 10 - Principes actifs, notamment du type ester hétérosidique
d'acide caféique, tels qu'obtenus par la mise en oeuvre du procédé
selon l'une quelconque des revendications 2 à 9.

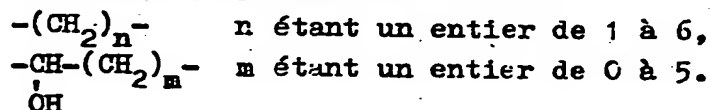
11 - Nouveaux médicaments, caractérisés en ce qu'ils contien-
nent au moins un principe actif selon la revendication 10.

20 12 - Nouveaux médicaments, caractérisés en ce qu'ils contien-
nent au moins un ester hétérosidique d'acide caféique dérivé d'un
hétéroside de dihydroxyphénylalcaneol, notamment de dihydroxyphé-
nyléthanol ou de β -hydroxy β -(dihydroxyphényl)éthanol.

13 - Médicaments selon la revendication 12, caractérisés en ce
25 que l'ester hétérosidique présente la formule



30 dans laquelle X représente un radical



14 - Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle
35 comprend au moins un ester hétérosidique d'acide caféique, notam-
ment un médicament selon l'une quelconque des revendications 11 à
13, en association avec la dihydroxyphénylalanine, de préférence
sous sa forme lévogyre.